

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21596

研究課題名（和文）筋肉と腎の機能的連関メカニズムの解明

研究課題名（英文）Pathophysiological connections between muscle and kidney

研究代表者

森 建文（Mori, Takefumi）

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40375001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：筋肉から血中に分泌されたマイオカインにより、尿細管からの一酸化窒素産生が亢進し、腎髄質循環と低酸素が改善し腎組織保護につながるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、動物実験、*ex vivo*ライブイメージングおよび細胞実験を行った。マイオカインの1つであるアイリシンは尿細管からの一酸化窒素産生を亢進させ、腎髄質循環と低酸素状態を改善させるとともに、尿細管細胞にも保護的に作用していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会では少しでも自立できる身体をめざすことが重要である。本研究により、筋肉と腎臓の連関のメカニズムに筋肉から血中に分泌されたマイオカインが関与していることが明らかとなった。すなわち、高齢者での運動療法による筋肉量の保持が腎保護にも有用である可能性が示された。本研究結果が臨床応用されることにより、高齢者の自立活動の増進、末期腎不全に伴う透析導入の回避ができ、超高齢社会の健康寿命の延長と生活の質向上に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that myokine secreted from the muscle into the blood would enhance nitric oxide production from the renal tubules resulting in improvement of renal medullary circulation and hypoxia, which would lead to renal tissue protection. To test this hypothesis, we conducted animal experiments, *ex vivo* live imaging, and cellular experiments. Irisin, a myokine, increased nitric oxide production from the tubules. This increased renal medullary flow and improved hypoxia and fibrosis in the renal medulla.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：マイオカイン 酸化ストレス 腎障害 筋肉 線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会においてサルコペニアやフレイルといった筋肉量もしくは筋肉の運動耐用能の低下が健康寿命を短縮している。さらに、近年、超高齢者の末期腎不全患者が増加しており、サルコペニアやフレイルによる生活の質の低下や生命予後の悪化が懸念されている。

筋肉と腎臓は密接に関連している臓器であり、腎機能の低下による尿毒素の蓄積は筋肉の萎縮を招き、この筋萎縮により腎機能の更なる低下が起きるといふ悪循環が存在していると考えられる。我々はこれまでに慢性腎臓病患者では尿毒物質のインドキシル硫酸の血中濃度が上昇していること、血中インドキシル硫酸濃度は筋肉量と負に関連すること、インドキシル硫酸はミトコンドリアでのアデノシン三リン酸(ATP)合成を阻害して筋肉細胞の増殖抑制に作用していることを報告している(1, 2)。また、腎不全を呈する5/6腎摘腎不全ラットにおいて、運動負荷により腎組織障害と腎機能が改善する。これは運動による一過性の低酸素により酸化ストレスが亢進し、代償的に一酸化窒素(NO)合成酵素の発現が亢進し、NOが産生され、腎血流が改善するためと考えられている。加えて、筋肉より分泌されるマイオカインのひとつであるアイリシンが形質転換増殖因子 β (TGF- β)系を抑制して腎障害を改善すると報告されている(3)。

2. 研究の目的

我々は、筋肉から血中に分泌されたマイオカインにより、尿細管からのNO産生が亢進し、腎髄質循環と低酸素が改善し腎組織保護につながるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、動物実験、ex vivo ライブイメージングおよび細胞実験を行い、筋肉と腎臓の連関のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイオカインによる腎血流への影響(急性動物実験)

雄性 Sprague Dawley (SD)ラットにおいて、トレッドミル運動負荷(ラット用トレッドミル、20 m/分×30 分/日、週 5 日、4 週間)群、運動負荷を行わないコントロール群から採血し血清を得る。この血清およびマイオカインの一種であるアイリシンをSDラットの静脈内に投与し、レーザードップラー血流計やパワーラブシステムを用いて糸球体濾過量、腎皮質・髄質血流量、腎間質圧等の測定を行い、運動負荷血清投与群と運動非負荷血清投与群での変化を比較する。また、腎局所NOや酸化ストレスを経時的変化は、透析膜のついたmicrodialysisプローブを間質に挿入することにより腎局所の間質液を回収して測定する。糸球体濾過量は既報(4)と同様に蛍光イヌリンを用いて測定する。以上により、筋肉から放出される液性因子・マイオカインの腎血流への効果を明らかにする。

(2) 腎うっ血モデルラットを用いたインターベンション実験

腎静脈圧上昇に伴う腎血流の低下により腎間質線維化が進行する腎うっ血モデルラット(5)を用い、血中アイリシン濃度を上昇させるフラボノイド(6)を投与する。血液、腎臓のサンプリングを行い、血漿・尿中浸透圧・電解質、尿中アルブミン排泄量等の生化学値、腎組織の表現型を分子生物学的に解析する。分子生物学的に解析として、遺伝子発現はリアルタイムPCR、タンパク質発現はウェスタンブロット、タンパク質の局在は免疫組織染色にてそれぞれ検討する。組織染色としては、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・マッソン染色を用いる。以上により、

腎血流の変化に伴う腎障害に対するマイオカインの効果を明らかにする。

(3) Ex vivo ライブイメージングによるマイオカインの活性酸素、過酸化水素および NO の産生動態の観察

マイクロダイセクション法でラット尿細管を単離して、アイリシンが活性酸素や NO 等の産生に与える影響を明らかにする。エチジウムブロマイド(活性酸素)、CHDF-DA (過酸化水素)、DAF-2AM (NO)、Fluo-4 (カルシウム)の蛍光色素で染色し、これらの産生動態を共焦点顕微鏡や急行高度計でリアルタイムに観察する。

(4) 尿細管や集合管細胞、糸球体上皮細胞用いたマイオカインの細胞内メカニズムの解明
尿細管 HEK 細胞、集合管 M1 細胞、糸球体上皮細胞を TGF- β 誘導性に線維化した後、アイリシンを投与する。刺激後、細胞を回収し、リアルタイム PCR やウェスタンブロット法、免疫染色といった分子生物学的検討により、マイオカインが関連する遺伝子群を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マイオカインによる腎血流への影響(急性動物実験)

トレッドミル運動負荷ラットにおいて、マイオカインの 1 つであるアイリシンの血清濃度は上昇していた。レーザードップラーによる腎局所血流測定では、アイリシン(5 ng)投与により腎髄質血流の上昇を認めた(図 1)が、全身血圧や脈拍、腎皮質血流に変化が認められなかった。

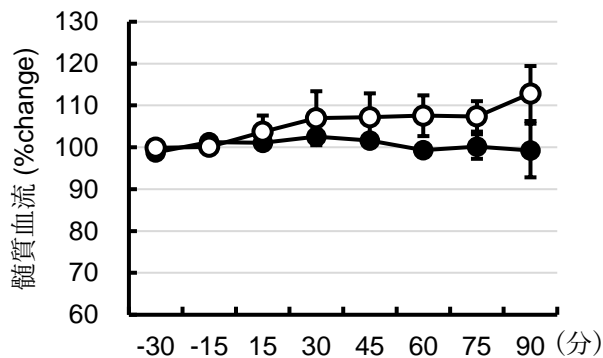
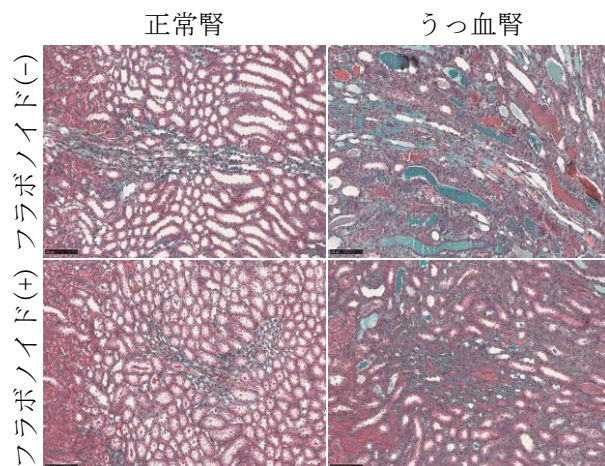


図 1. 腎髄質血流の変化
黒丸：コントロール、白丸：アイリシン(5 ng)投与. 0分：Vehicle 若しくはアイリシン投与.

(2) 腎うっ血モデルラットを用いたインターベンション実験

フラボノイド投与により血中アイリシンは上昇した。腎うっ血モデルにこのフラボノイドを投与したところ、腎重量に変化は認められなかったものの、腎髄質外層にて線維化の抑制が認められた(図 2)。加えて、分子生物学的解析においても、腎髄質外層での線維化マーカーであるフィブロネクチンやコラーゲン、血小板由来成長因子受容体(Pdgfrb)の遺伝子・タンパク質発現の抑制が認められた。一方、腎皮質ではアイリシン投与による線維化抑制効果が認められなかった。

図 2. フラボノイド投与による腎線維化抑制効果(EM 染色). Scale bar = 100 μ m.



(3) Ex vivo ライブイメージングによるマイオカインの活性酸素、過酸化水素およびNOの産生動態の観察

カルシウム蛍光プローブのFluo-4を用いた集合管細胞でのアイリシン刺激による細胞内カルシウムイオンの変化が認められた。アイリシン濃度依存的な細胞内カルシウムイオンの上昇を認め、アイリシン投与による腎髄質血流の上昇には内皮型一酸化窒素(eNOS)を介したNO産生が関与していると考えられた。

(4) 尿細管や集合管細胞、糸球体上皮細胞用いたマイオカインの細胞内メカニズムの解明

マウス腎皮質集合管由来培養細胞であるM1細胞において、TGF- β による線維化の誘導が線維化マーカーであるフィブロネクチンのmRNA・タンパク質発現の上昇および免疫染色にて確認された。アイリシンはこのフィブロネクチンの発現上昇を抑制した。上皮間葉形質転換のマーカーであるNカドヘリンについても、TGF- β 刺激により上昇したが、アイリシンはこの発現上昇を抑制した。加えて、TGF- β 誘導性に異常の認められる解糖系酵素群の遺伝子発現についてもアイリシン投与により正常化した。

以上の結果より、マイオカインの1つであるアイリシンは尿細管からのNO産生を亢進させ、腎髄質循環と低酸素状態を改善させるとともに、尿細管細胞にも保護的に作用していると考えられた。

<引用文献>

1. Sato E, Mori T, Mishima E, Suzuki A, Sugawara S, Kurasawa N, Saigusa D, Miura D, Morikawa-Ichinose T, Saito R, Oba-Yabana I, Oe Y, Kisu K, Naganuma E, Koizumi K, Mokudai T, Niwano Y, Kudo T, Suzuki C, Takahashi N, Sato H, Abe T, Niwa T, Ito S. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2016;6:36618.
2. Sato E, Saigusa D, Mishima E, Uchida T, Miura D, Morikawa-Ichinose T, Kisu K, Sekimoto A, Saito R, Oe Y, Matsumoto Y, Tomioka Y, Mori T, Takahashi N, Sato H, Abe T, Niwa T, Ito S. Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins (Basel).* 2017;10(1):19.
3. Peng H, Wang Q, Lou T, Qin J, Jung S, Shetty V, Li F, Wang Y, Feng XH, Mitch WE, Graham BH, Hu Z. Myokine mediated muscle-kidney crosstalk suppresses metabolic reprogramming and fibrosis in damaged kidneys. *Nat Commun.* 2017;8(1):1493.
4. Lorenz JN, Gruenstein E. A simple, nonradioactive method for evaluating single-nephron filtration rate using FITC-inulin. *Am J Physiol - Renal Physiol.* 1999;276(1):F172-F177.
5. Shimada S, Hirose T, Takahashi C, Sato E, Kinugasa S, Ohsaki Y, Kisu K, Sato H, Ito S, Mori T. Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model. *Sci Rep.* 2018;8(1):16808.
6. Zhou Q, Chen K, Liu P, Gao Y, Zou D, Deng D, Deng H, Huang Y, Zhang Q, Zhu J, Mi M. Dihydropyridin stimulates irislin secretion partially via the PGC-1 α pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;412:349-357.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Shingo, Satoh Michihiro, Metoki Hirohito, Murakami Takahisa, Asayama Kei, Hara Azusa, Hirose Takuo, Kanno Atsuhiko, Inoue Ryusuke, Tsubota-Utsugi Megumi, Kikuya Masahiro, Mori Takefumi, Hozawa Atsushi, Imai Yutaka, Ohkubo Takayoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Lifetime risk of stroke stratified by chronic kidney disease and hypertension in the general Asian population: the Ohasama study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-021-00635-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamakoshi Seiko, Ito Osamu, Rong Rong, Ohsaki Yusuke, Nakamura Takahiro, Hirose Takuo, Takahashi Kazuhiro, Mori Takefumi, Totsune Kazuhito, Kohzuki Masahiro	4. 巻 75
2. 論文標題 High Salt Intake-Increased (Pro)renin Receptor Expression Is Exaggerated in the Kidney of Dahl Salt-Sensitive Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Takefumi, Hirose Takuo, Kinugasa Satoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Treatment of renal congestion by tolvaptan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 745 ~ 748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-019-0215-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hirose T, Matsuki T, Takahashi C, Oba-Yabana I, Kato T, Tajima R, Seki T, Kinugasa S, Nakamura H, Tani J, Mori T
2. 発表標題 Tubulointerstitial injury was suppressed by inhibition of platelet-derived growth factor pathway in rat renal venous congestion model
3. 学会等名 Joint Meeting ESH-ISH 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬卓男, 高橋知香, 山越聖子, 矢花郁子, 遠藤明里, 阿南剛, 中山晋吾, 田島亮, 加藤季子, 関敬之, 中村はな, 谷淳一, 高橋和広, 森建文
2. 発表標題 骨格筋由来生理活性物質アイリシンの腎集合管細胞に対する効果
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirose T, Matsuki T, Takahashi C, Yamakoshi S, Oba-Yabana I, Endo A, Anan G, Kato T, Tajima R, Seki T, Nakayama S, Nakamura H, Tani J, Mori T
2. 発表標題 Renoprotective effect of SGLT1/2 inhibitor in rat renal congestion model
3. 学会等名 Council on Hypertension Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬卓男, 松木琢磨, 高橋知香, 矢花郁子, 遠藤明里, 阿南剛, 田島亮, 三宅由桂, 加藤季子, 遠山真弥, 中山晋吾, 関敬之, 中村はな, 衣笠哲史, 谷淳一, 森建文
2. 発表標題 ラット腎うっ血モデルにおける腎障害に対するSGLT阻害の効果
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirose T, Matsuki T, Takahashi C, Shimada S, Oba-Yabana I, Kinugasa S, Nakamura H, Tani J, Mori T
2. 発表標題 (Pro)renin receptor expression in rat renal congestion model
3. 学会等名 Gordon Research Conference Angiotensin (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森建文, 廣瀬卓男, 大崎雄介, 高橋知香, 矢花郁子
2. 発表標題 腎うっ血における腎循環とバゾプレシン2型受容体の役割の検討
3. 学会等名 第30回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬卓男, 高橋知香, 矢花郁子, 加藤季子, 関敬之, 中村はな, 衣笠哲史, 谷淳一, 森建文
2. 発表標題 腎集合管細胞に対する筋由来生理活性物質アイリシンの効果の検討
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬卓男, 高橋知香, 松木琢磨, 中山晋吾, 衣笠哲史, 矢花郁子, 加藤季子, 関敬之, 中村はな, 谷淳一, 森建文
2. 発表標題 光学顕微鏡用腎組織標本の低真空走査電子顕微鏡を用いた観察
3. 学会等名 第48回宮城県腎不全研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森建文, 廣瀬卓男, 湯村和子
2. 発表標題 腎臓領域におけるLVSEMの活用と展望
3. 学会等名 第3回腎生検LVSEM研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤恵美子, 等々力崇太, 山本多恵, 宮崎真理子, 森建文, 伊藤貞嘉, 佐藤博, 高橋信行
2. 発表標題 ジカルボニルストレスが及ぼす筋細胞への影響
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

講座HP https://tohokupd.jimdofree.com/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 修 (Ito Osamu) (00361072)	東北医科薬科大学・医学部・教授 (31305)	
研究分担者	廣瀬 卓男 (Hirose Takuo) (20599302)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山越 聖子 (Yamakoshi Seiko) (50868099)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 知香 (Takahashi Chika)	東北医科薬科大学・医学部・技術補佐員 (31305)	
連携研究者	大崎 雄介 (Ohsaki Yusuke) (40509212)	東北大学・農学研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関